

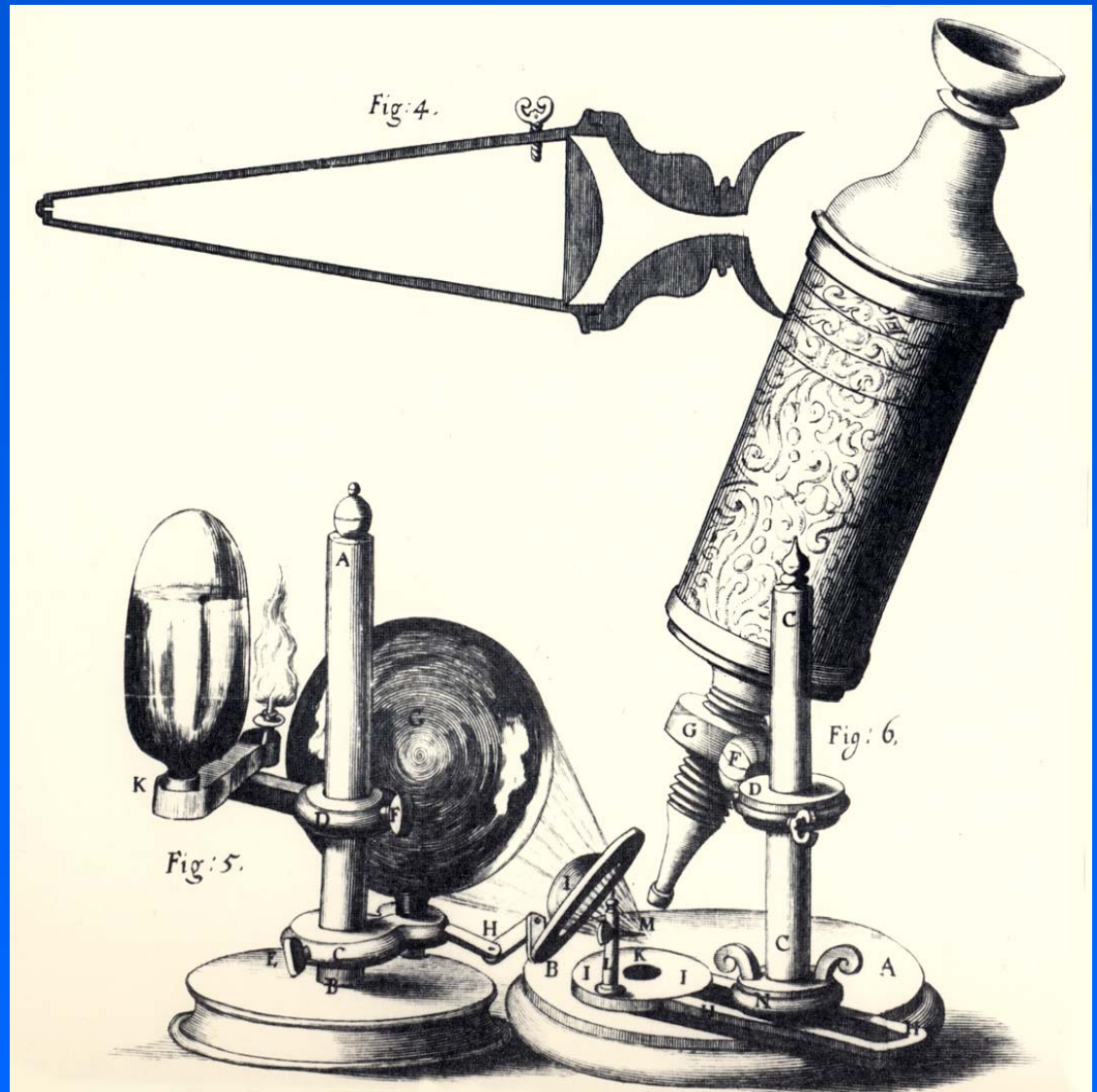
Лекция 1

Клеточная теория

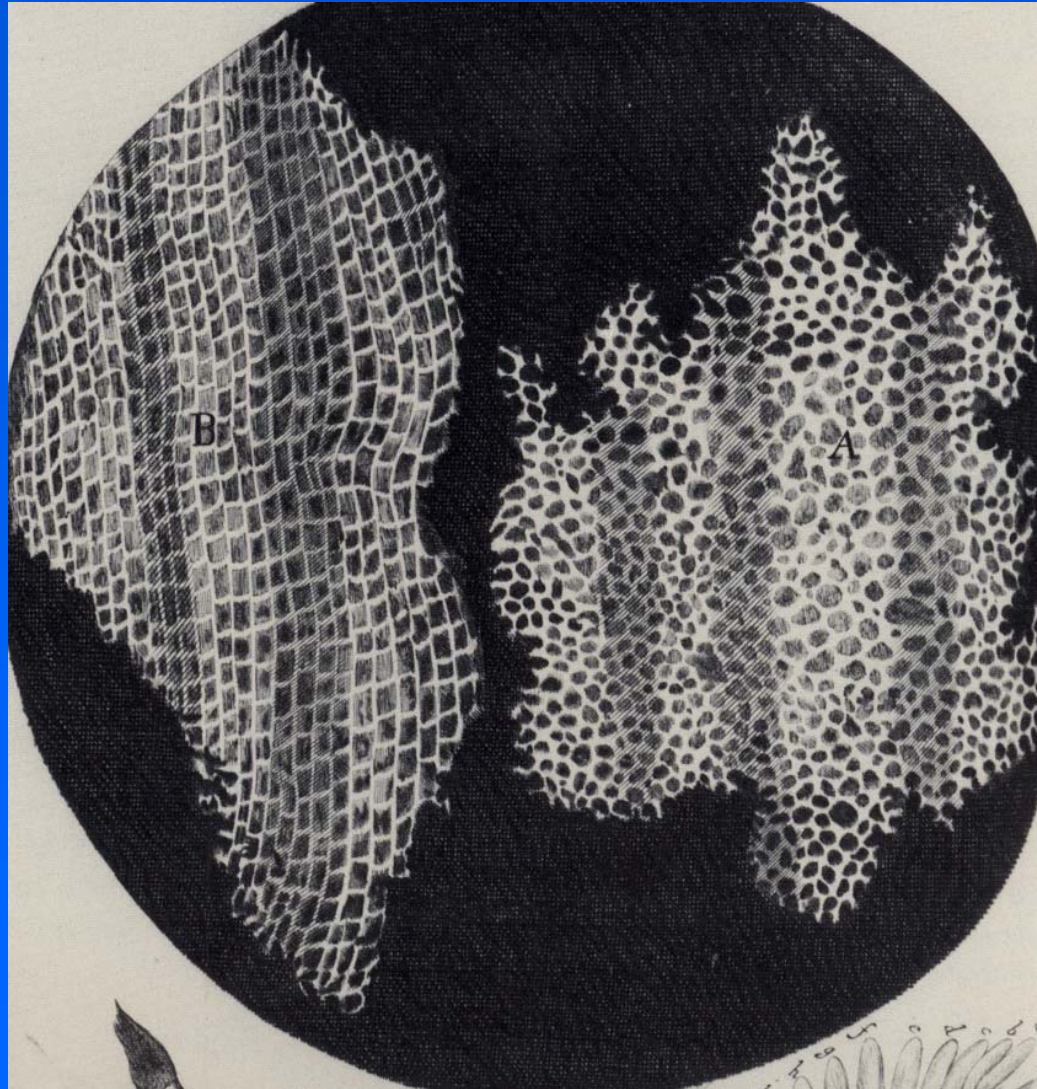
Общие схемы строения прокариот и эукариот (растения и животные)

Основные методы исследования клеток

Микроскоп Гука (около 1660 г.)



Первый рисунок клеток



Роберт Гук,
пробка,
1665 г.

**Лупа
 (“микроскоп”)
Левенгука,
конец 17
века
(копия)**



Бактерии из полости рта

uerer, viderim crescentem inter dentes quod

fig: A 

fig: B 

fig: E 

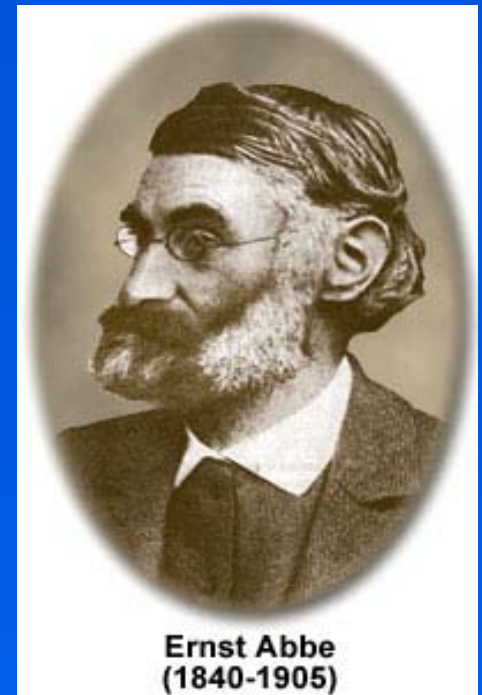
fig: F 



fig: G 

quandam all
fitem farina
lem. Hanc
censui, (lic
dignoscere n
men ei viva
esse. Sæpius
pluviatili p
animalcula in
salivæ immis
ore meo peti
aeris bullulas

Теория и микроскоп Аббе



Ernst Abbe
(1840-1905)

Изображение в микроскопе формируется в результате интерференции прямого и дифрагированного света. Объектив и окуляр микроскопа рассчитываются математически.

Предел разрешения микроскопа – около половины длины волны ($0,61\lambda/NA$).

Клетка - элементарная единица жизни

Клетка - открытая система, отделенная от внешней среды липопротеидной мембраной, способная к длительному самоподдержанию, росту и размножению без участия других клеток.

Источником энергии для жизнедеятельности клетки являются химические реакции.

Основные положения клеточной теории:

1. Все организмы состоят из клеток.
2. Новые клетки появляются только путем деления предсуществующих клеток (*omnis cellula e cellula*— Р. Вирхов).
3. Клетки разных организмов устроены и функционируют по единому плану.

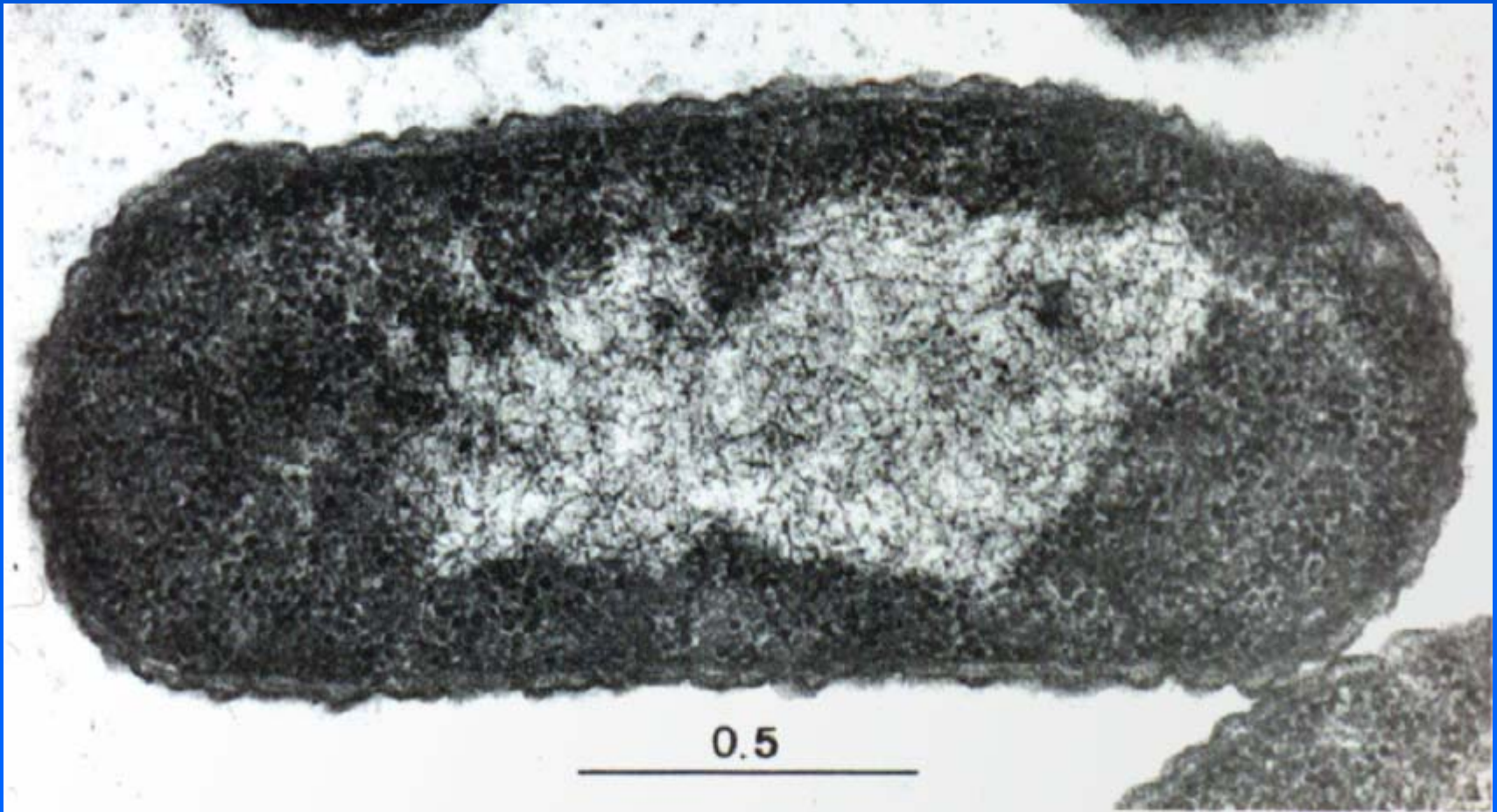
Основные постулаты клеточной биологии

1. Клеточная теория – клетка есть элементарная единица живого.
2. Клетка способна к размножению, ограничиваемому только внешней средой.
3. Поведение клеток описывается законами физиологии.
4. Клетки способны образовывать сложные популяции (колонии, ткани, органы) .
5. Клетки многоклеточного организма в процессе его формирования дифференцируются и утрачивают свою автономность.

Биологические законы в клеточной биологии

1. Основной закон физиологии: «все или ничего».
2. Гомеостаз внутренней среды.
3. Принцип эквифинальности в развитии (онтогенез и филогенез).
4. Способность клеток и субклеточных структур к самоорганизации.
5. Принцип несводимости – поведение клеточных популяций (ткани, органы) не описывается через поведение клеток; поведение клеток не описывается через поведение макромолекул.

Бактериальная клетка, срез



Бактериальная клетка, выросты поверхности

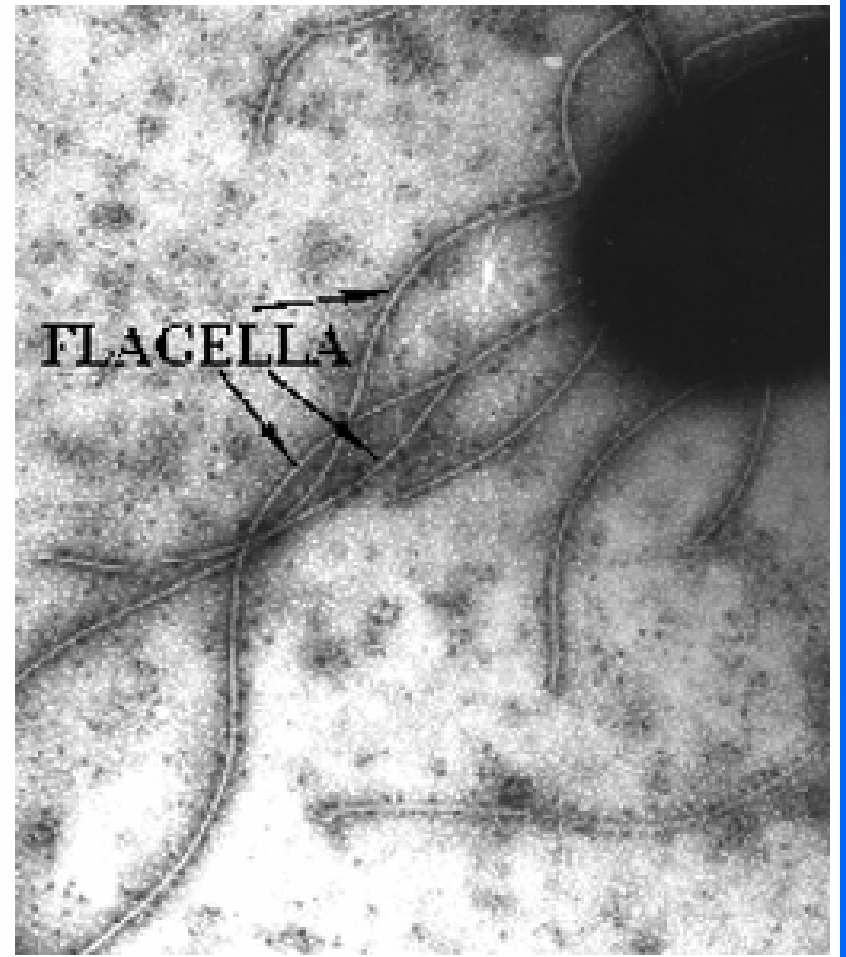
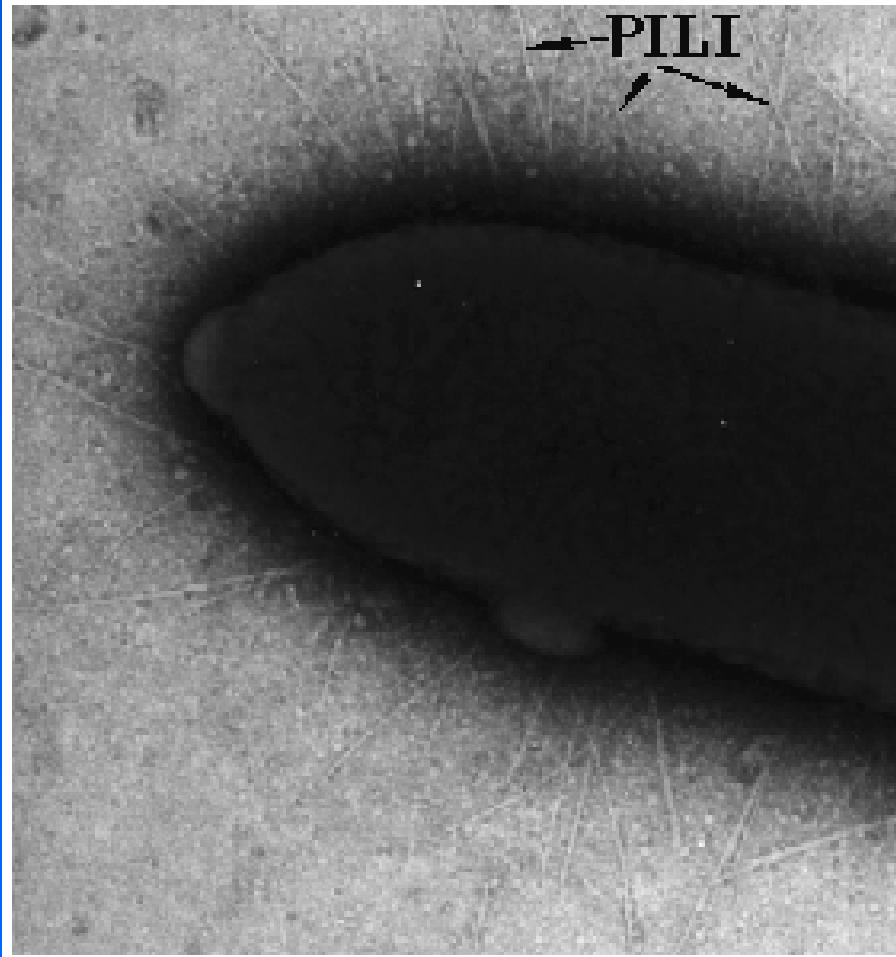
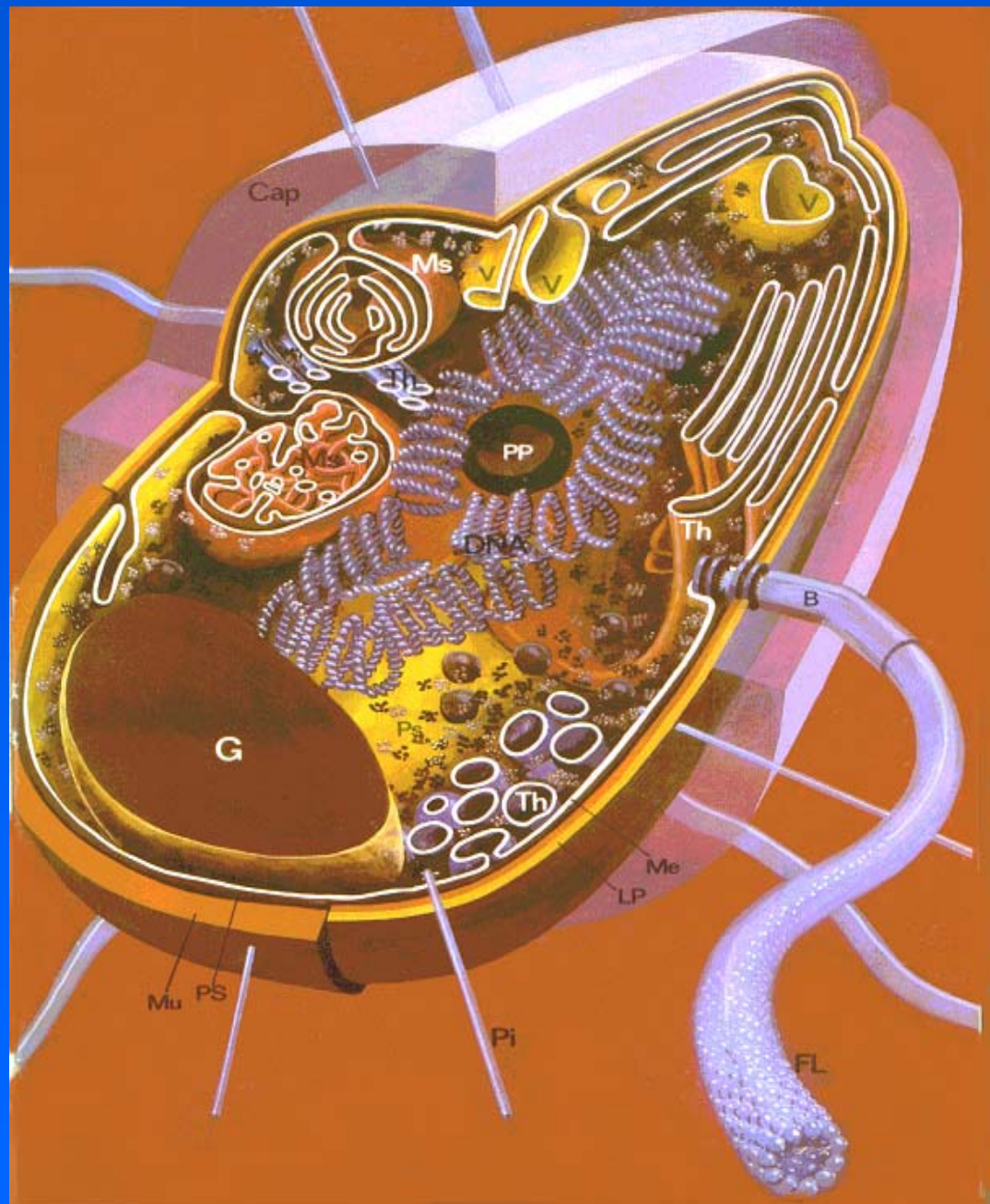
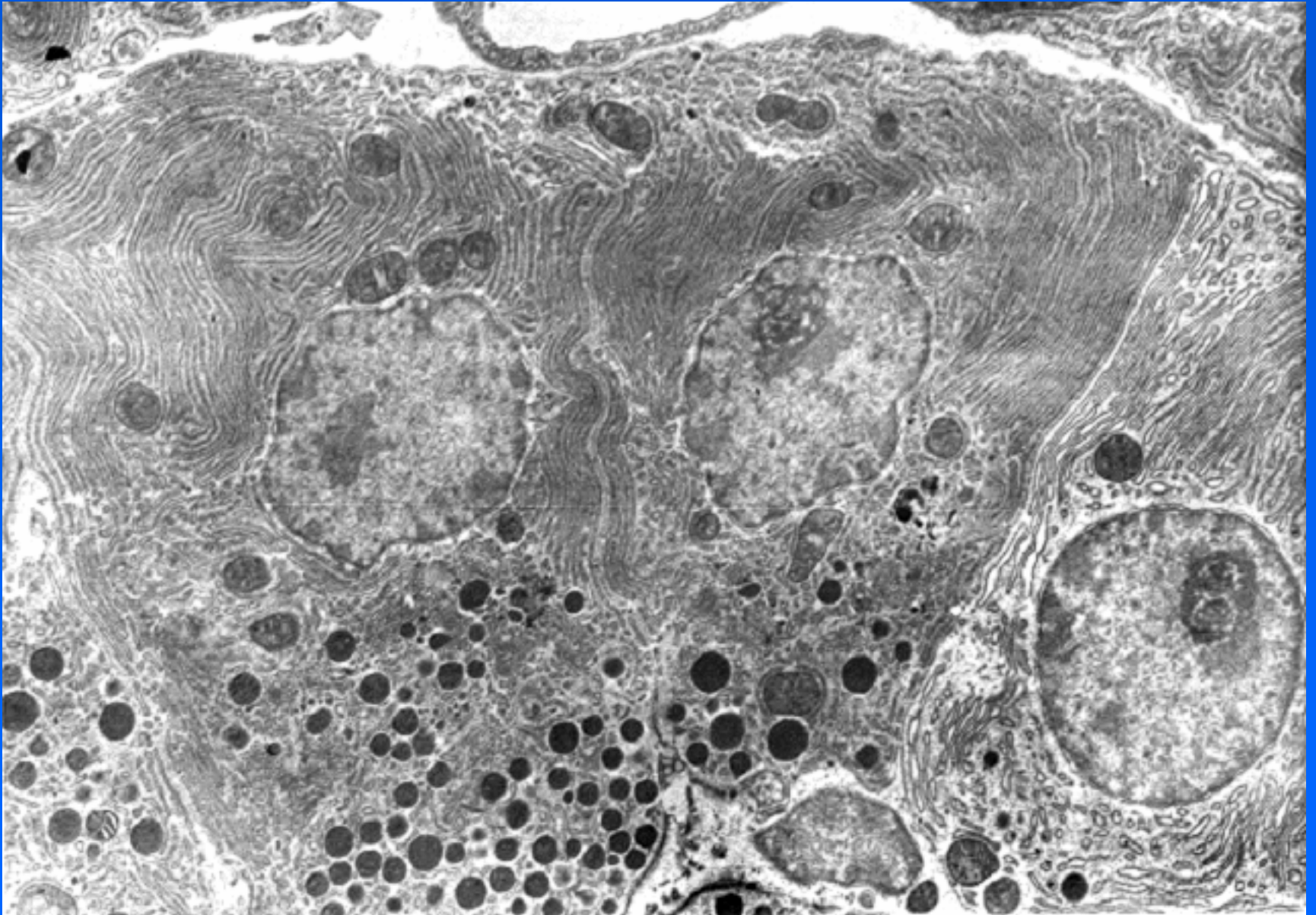


Схема бактериальной клетки



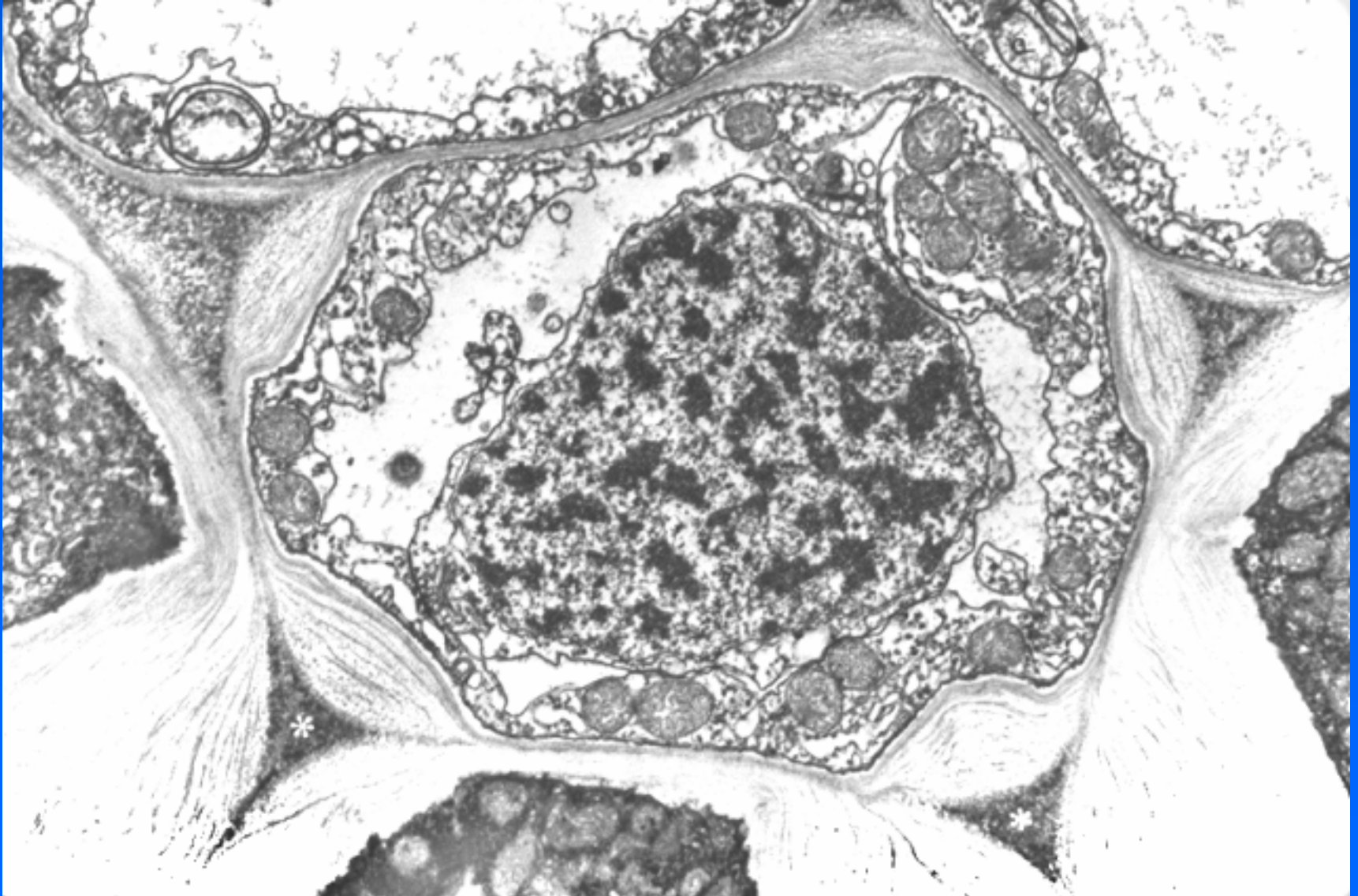
Животные клетки



Животная клетка - схема



Растительная клетка



Растительная клетка (схема)



Компоненты эукариотической клетки

Ядро: хранение, воспроизведение и реализация генетической информации (ДНК, РНК).

Гиалоплазма (цитозоль): система основного обмена.

Плазматическая мембрана: барьерно-рецепторная система.

Цитоскелет: опорно-двигательная система.

Вакуолярная система: система аккумуляции и сегрегации биополимеров (белков, углеводов) и продуктов метаболизма.

Митохондрии: энергообеспечение (электрохимический потенциал и синтез АТФ)

Пластиды: фотосинтез углеводов и АТФ.

Прокариоты и эукариоты – СХОДСТВО

- 1. Плазматическая липопротеидная мембрана с избирательной проницаемостью.**
- 2. ДНК – РНК – белок: ферменты, рибосомы, генетический код.**
- 3. Деление клетки – после репликации ДНК по полуконсервативному механизму.**
- 4. Нуклеозидтрифосфаты как основное промежуточное звено в биоэнергетике.**
- 5. Эффективный синтез АТФ связанный с мембраной (протонная помпа).**

Различия

Прокариоты	Эукариоты
Только плазмалемма	Мембранные органеллы
Одна кольцевая ДНК, опероны	Несколько линейных ДНК, индивидуальные промоторы и энхансеры каждого гена
Транскрипция и трансляция идут одновременно	Транскрипция и трансляция разобщены
Гистонов нет	Хроматин есть
Митотического аппарата нет	Митотический аппарат есть
Цитоскелета нет, транспорт за счет диффузии	Цитоплазма анизотропна, есть цитоскелет и быстрый транспорт вдоль него
Бактериальный жгутик, который вращается в мембране	Центриоль и эукариотический закрепленный жгутик
Размер клетки: 0,5-2 мкм	Размер клетки: 3-50 мкм

Клетки многоклеточного организма

1. В начале развития (дробление или ранний эмбриогенез) разделяются на клетки зародышевого пути (дают гаметы или споры) и соматические клетки (погибают).
2. Обособление соматических клеток происходит путем репрессии некоторых генов у большинства животных и растений и путем диминуции хроматина (выброса хромосом) у некоторых животных.
3. Среди соматических и половых клеток обособляются т.н. стволовые клетки, которые поддерживают соответствующие диффероны.
4. Дифференцировка соматических клеток, как правило, означает перестройку профиля экспрессии разных генов, но не изменение генома.
5. Дифференцировка половых клеток включает в себя деметилирование ДНК и проверку генома, а также мейоз.

Основные методы клеточной биологии

1. Исследование фиксированных клеток — микроскопия световая и электронная.
2. Исследование живых клеток — культура ткани, световая микроскопия.
3. Проточная цитофлюориметрия и сортировка клеток.
4. Направленная регуляция экспрессии генов и белков.
5. Фракционирование компонентов живых клеток и исследование бесклеточных систем (экстрактов).
6. Исследование белков и нуклеиновых кислот на уровне одиночных клеток.

Микроскопия световая

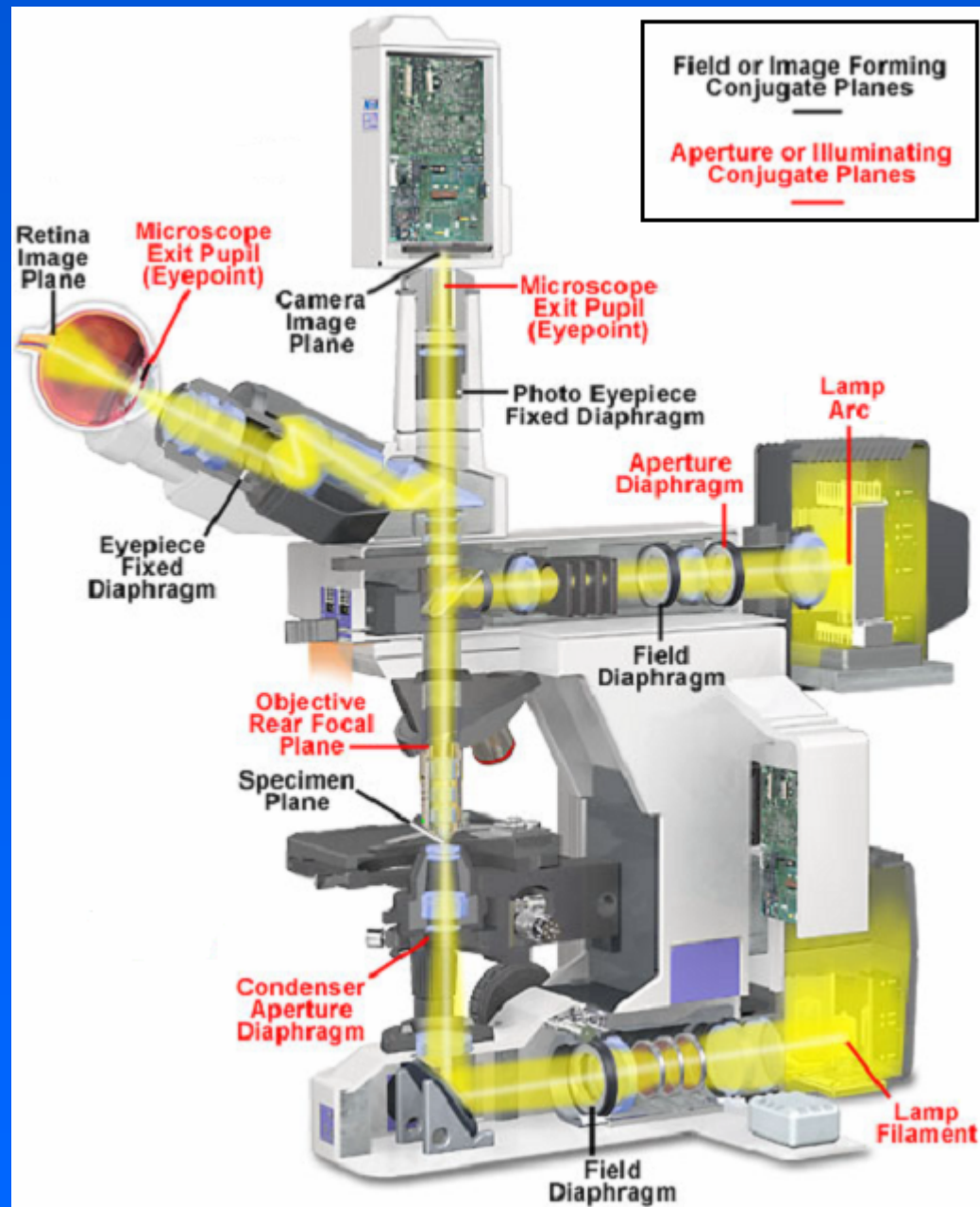
Световой микроскоп (просвечивающий, флюоресцентный, конфокальный) имеет пределе разрешения в 0,25 мкм (увеличение в 10-1500 раз), он позволяет исследовать живые и фиксированные клетки.

Окраски – поглощающие красители и флюоресцентные красители. Ограничения световой микроскопии: разрешающая способность и малая глубина резкости.

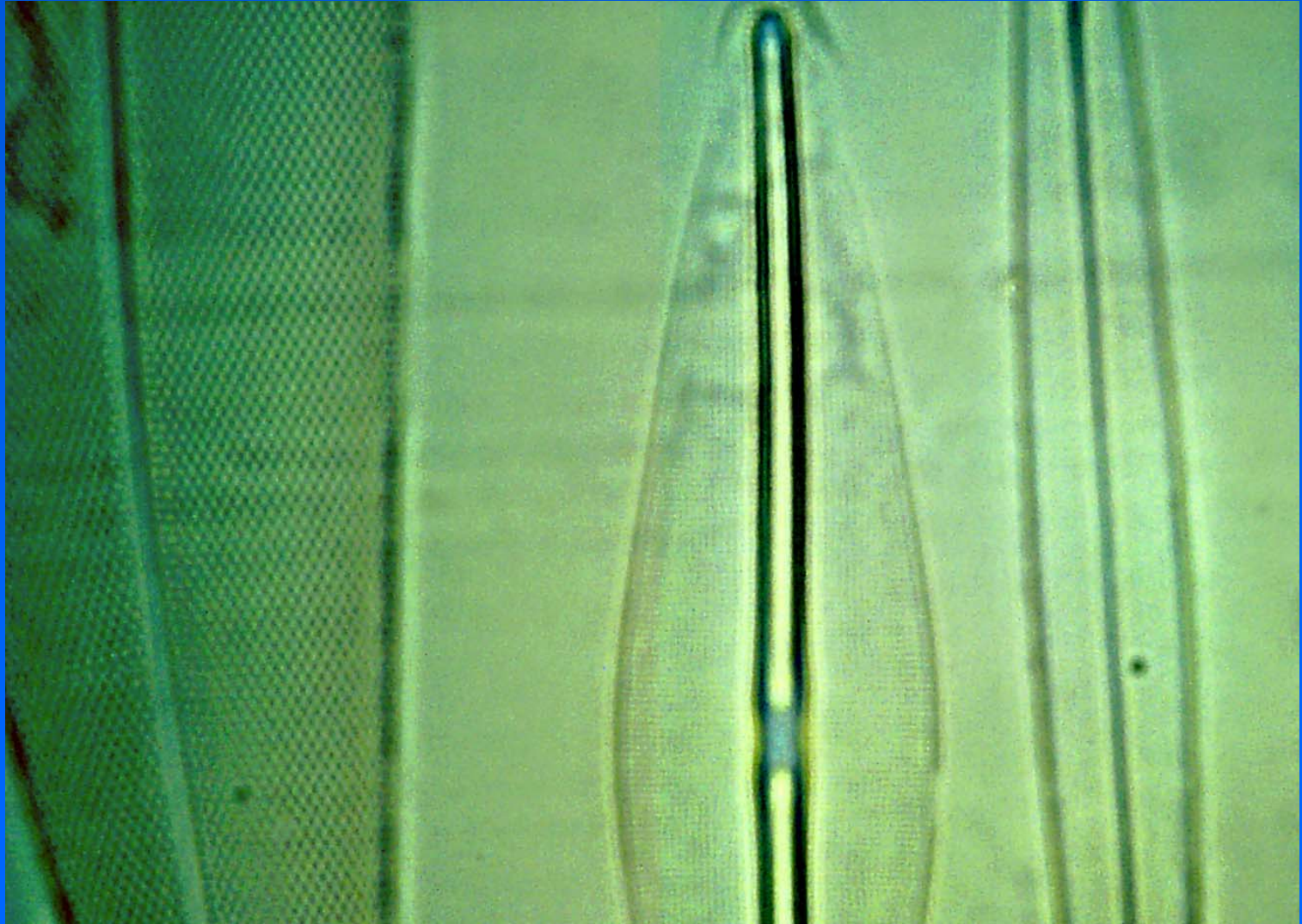
Способы освещения: проходящий свет (светлое поле, фазовый и интерференционный контраст), падающий свет (флюоресценция).

Флюоресцентная микроскопия позволяет детектировать отдельные молекулы.

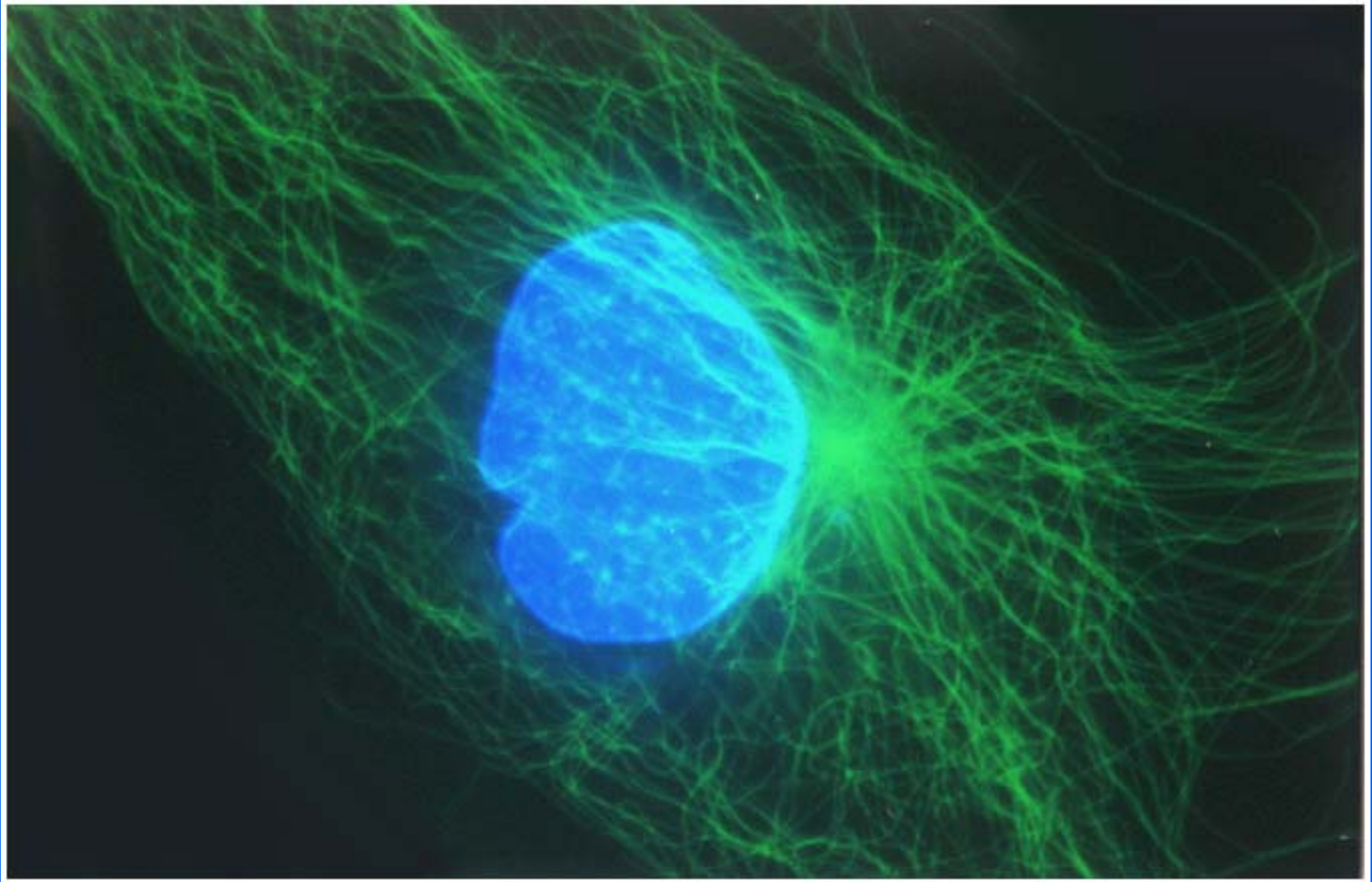
Исследовательский флюоресцентный микроскоп



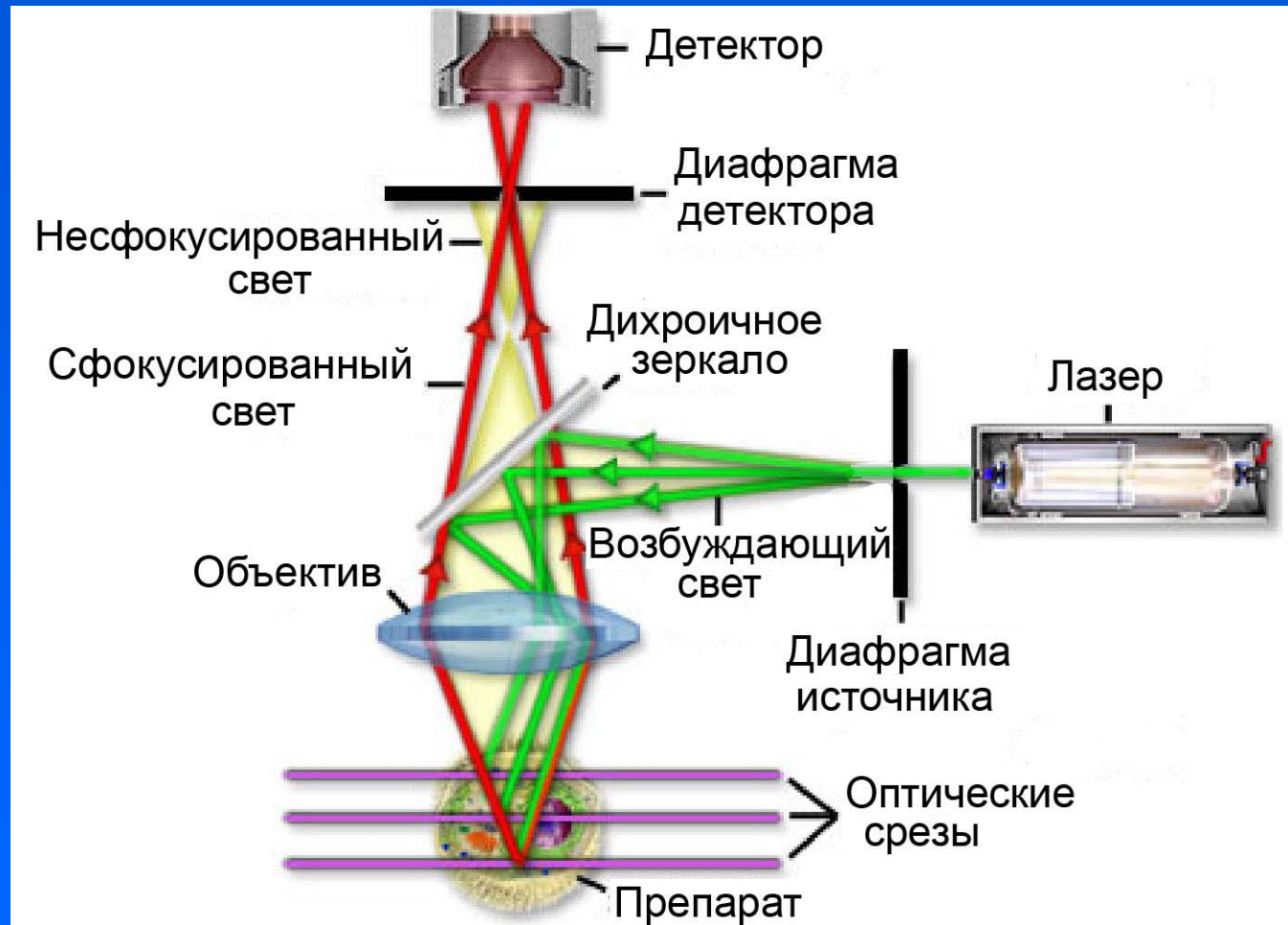
Диатомовые водоросли, объектив x100



Флуоресцентная микроскопия



Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп

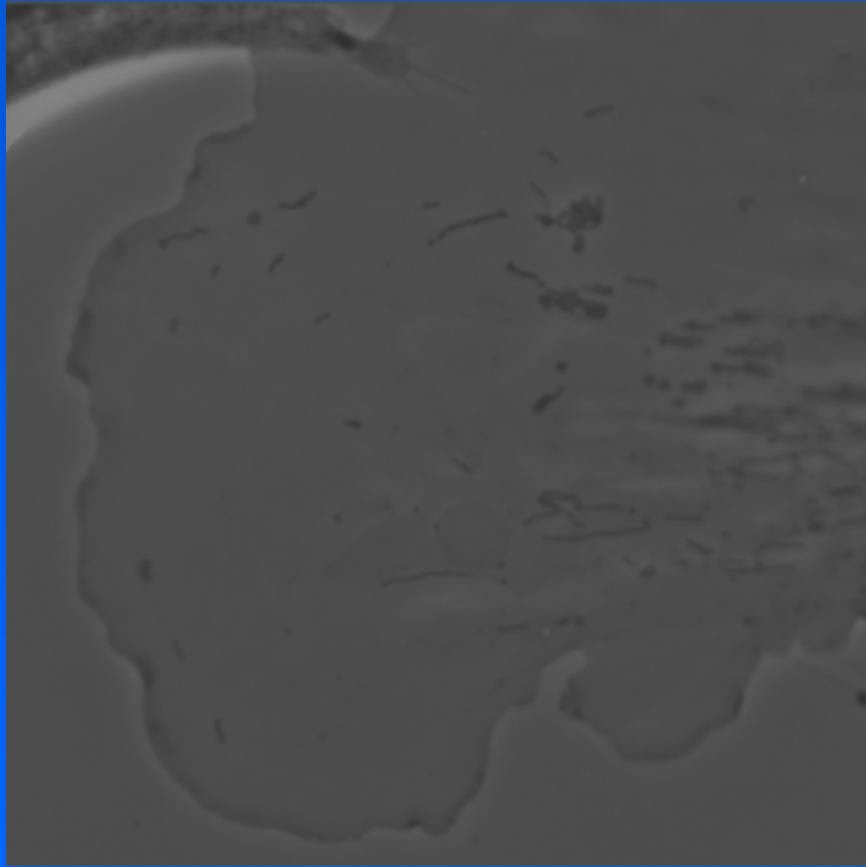


Охлаждаемая ПЗС камера

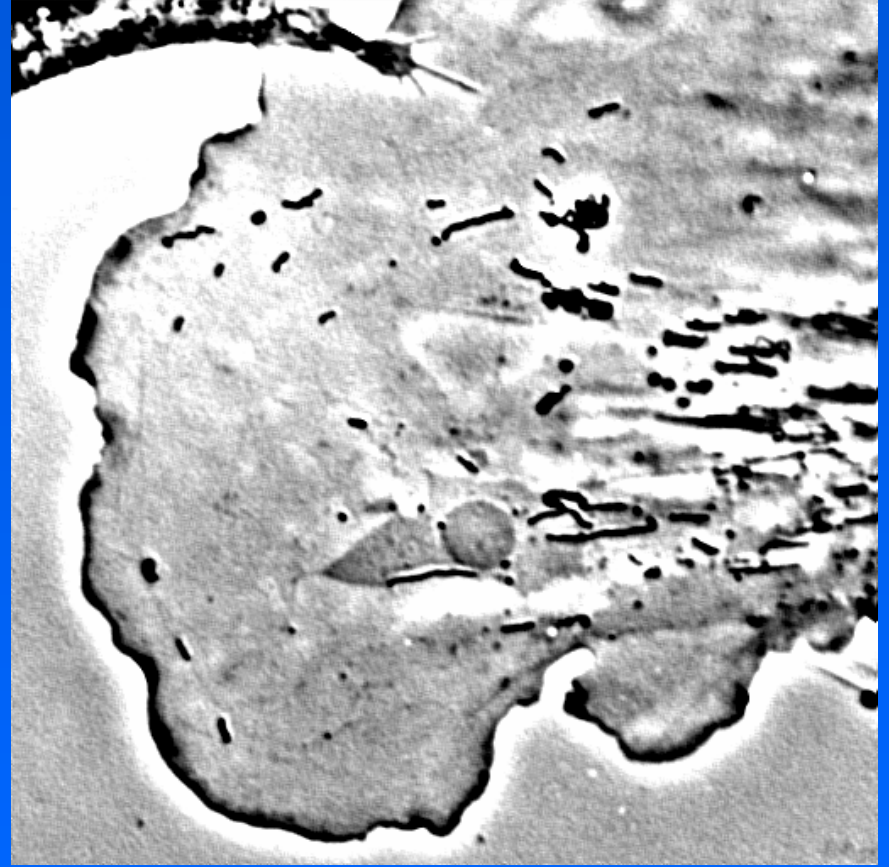


Камера позволяет регистрировать флюоресценцию отдельных молекул – квантовый выход достигает 95%

Усиление контраста за счет динамического диапазона камеры

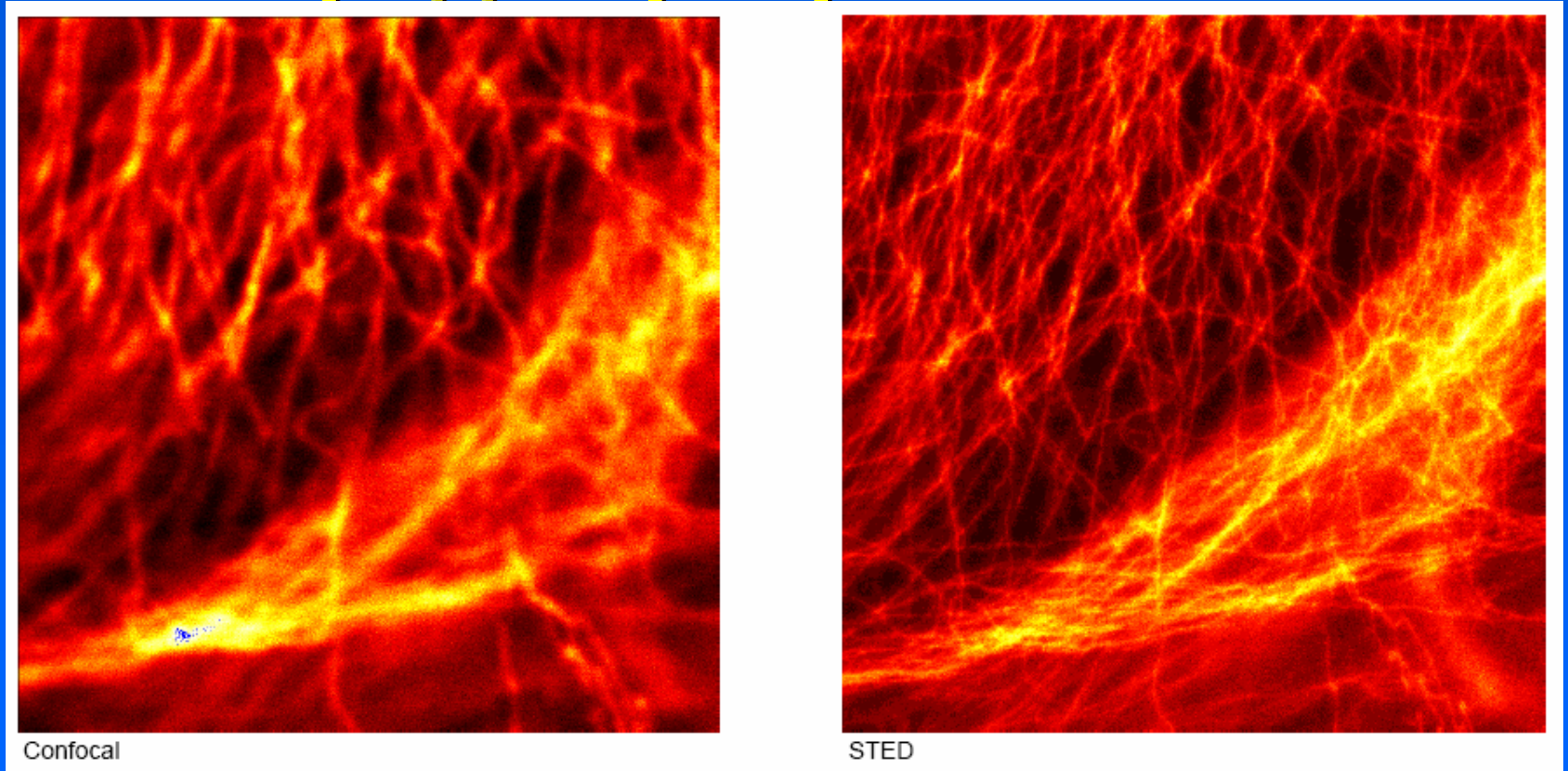


Исходный контраст



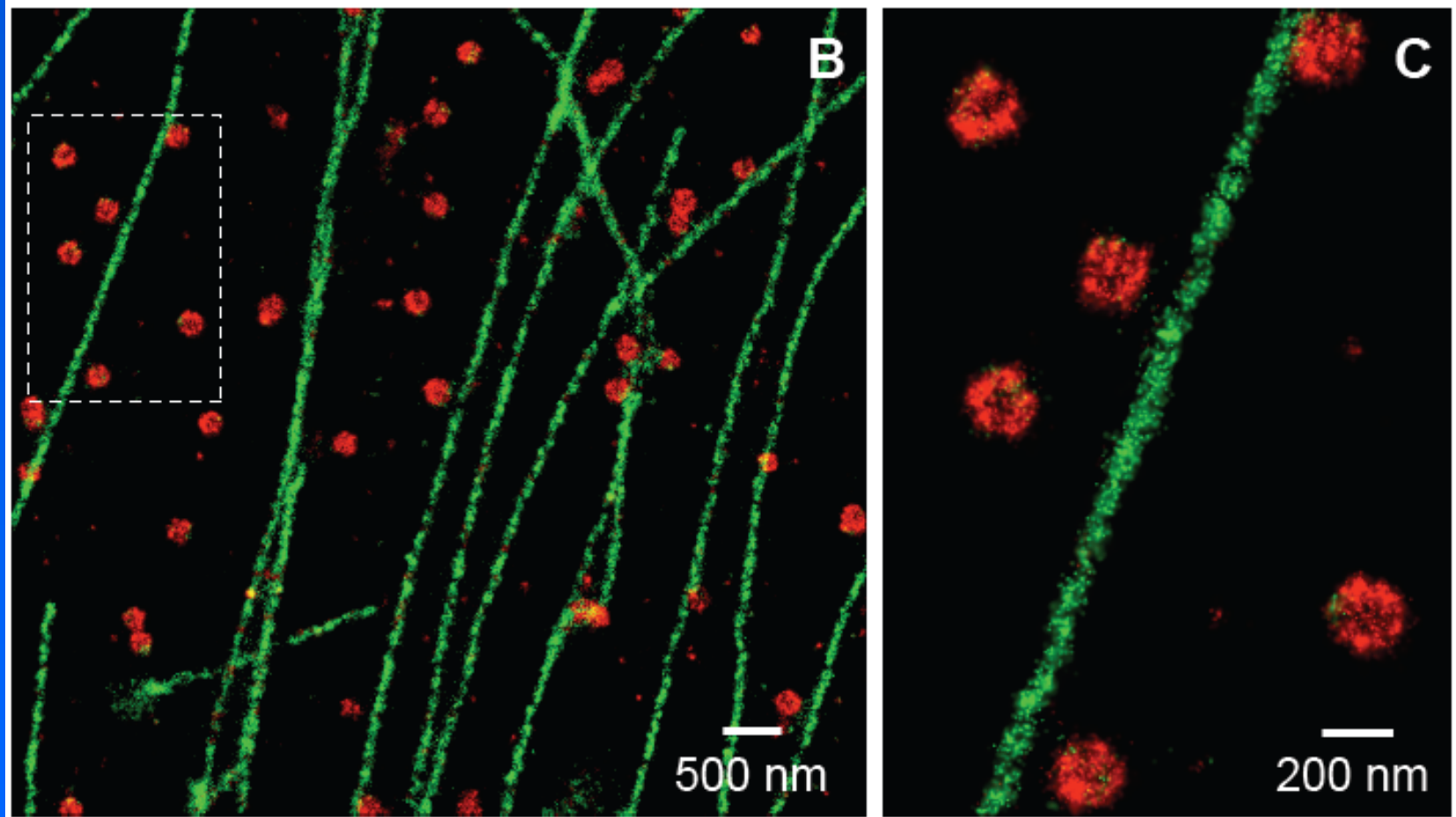
Контраст, увеличенный
в 50 раз

Световая микроскопия: переход за дифракционный предел разрешения



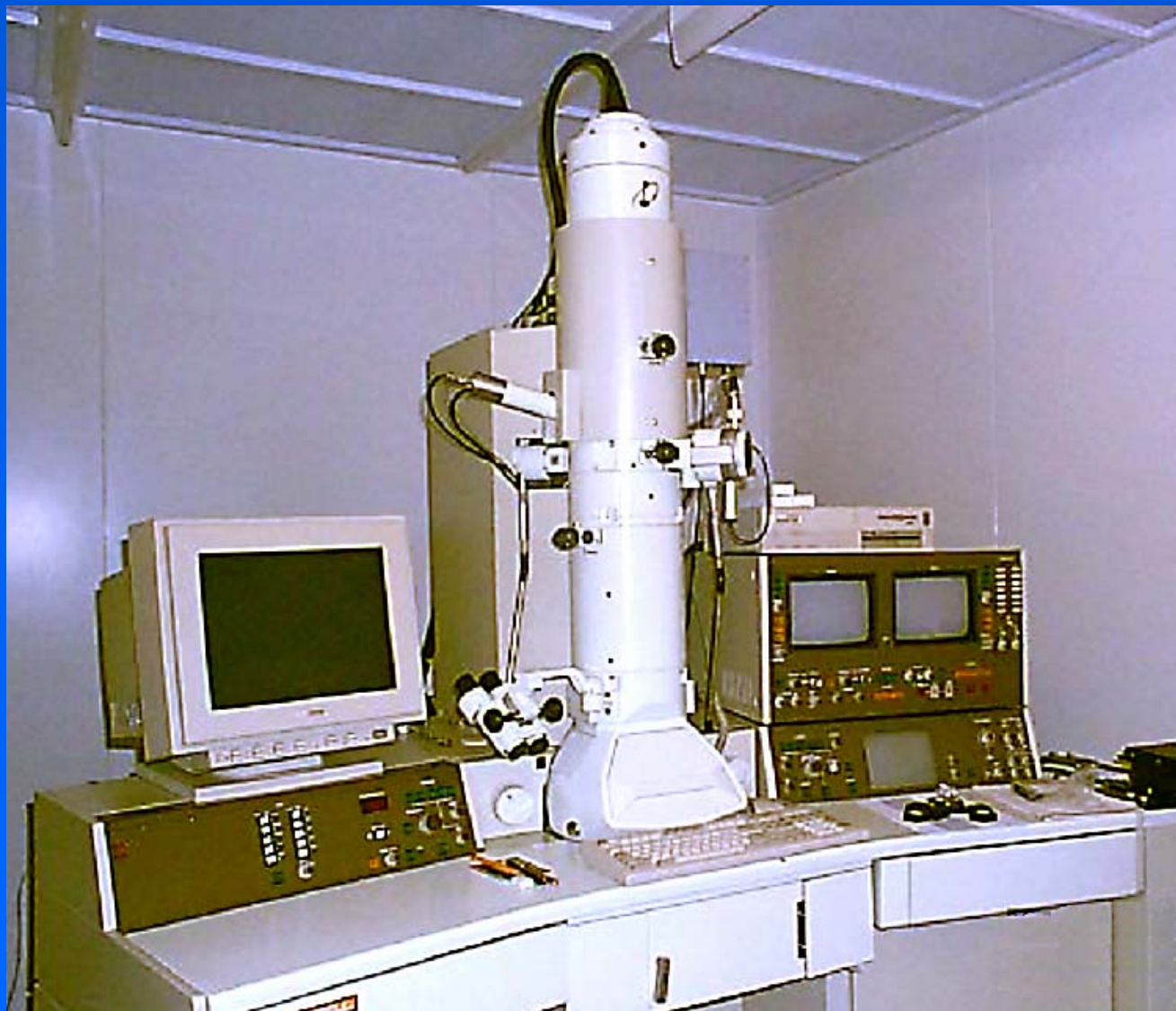
Принцип: детекция отдельных молекул и восстановление их положения расчетными методами.
Практическое разрешение – около 25 нм

STORM микроскопия, 2 цвета



**Клатриновые пузырьки и микротрубочки,
разрешение около 20 нм**

Электронный микроскоп, общий вид

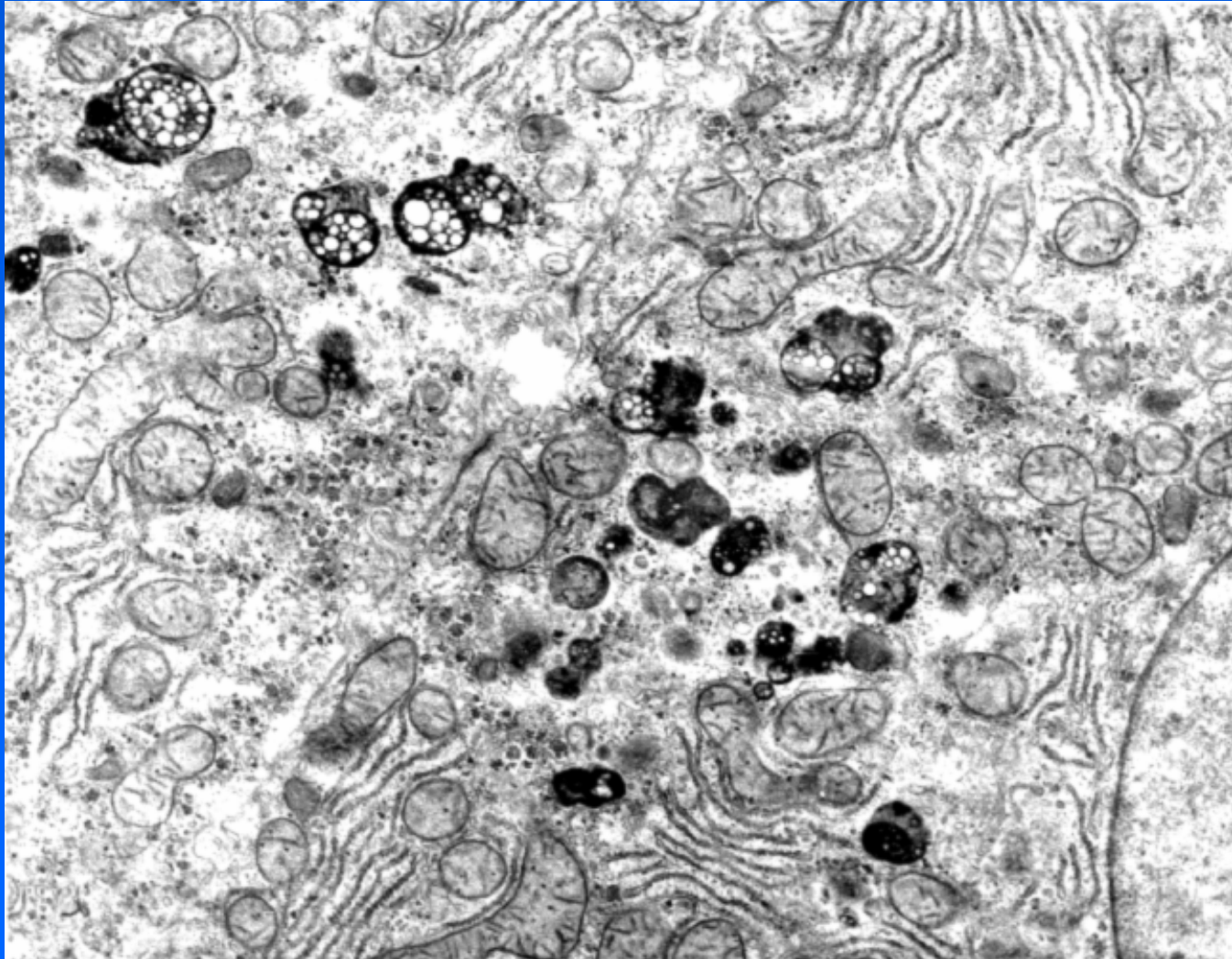


Микроскопия электронная

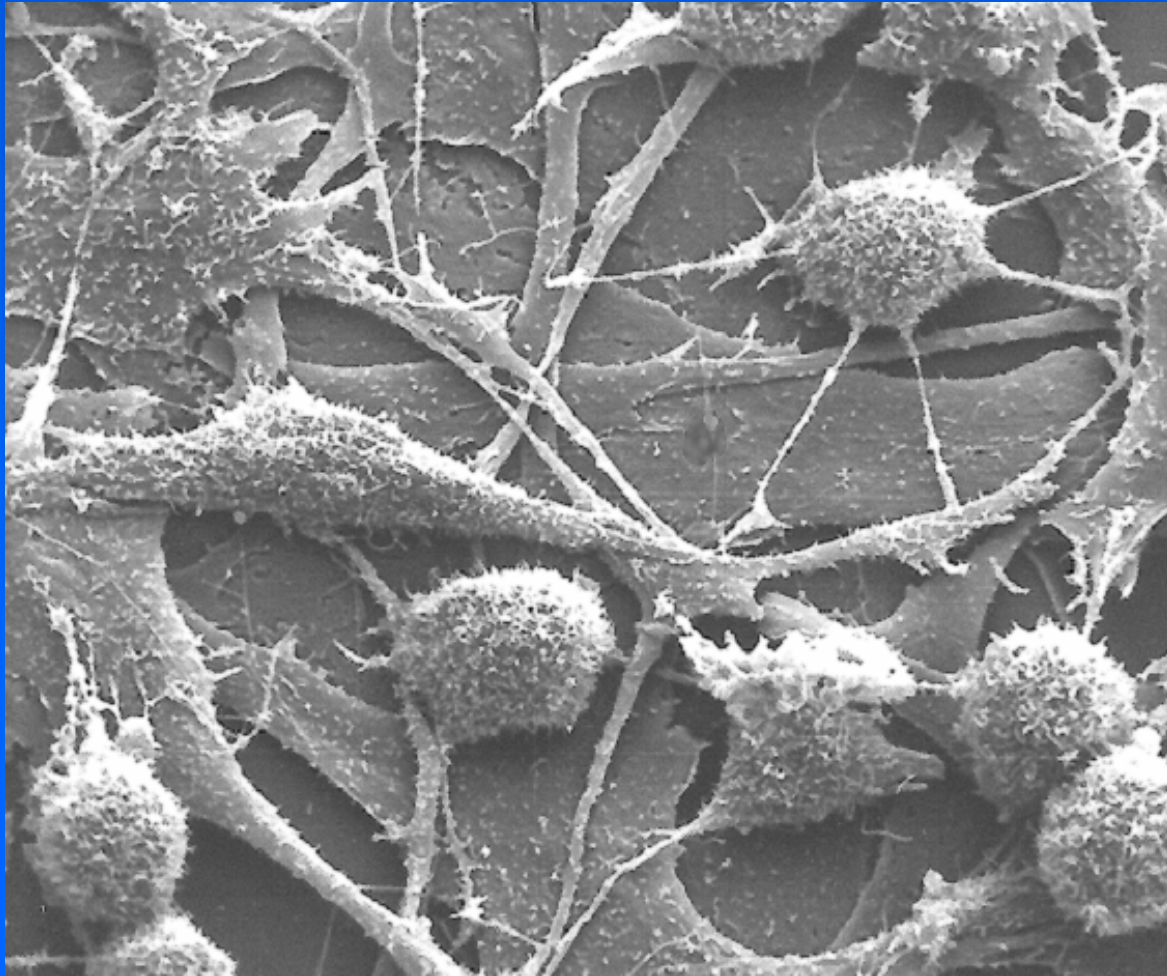
Электронный микроскоп (просвечивающий) – разрешение до 0,3 нм (увеличение в 1000-1000000 раз). Требуется высокого вакуума. Исследуются только тонкие препараты фиксированных клеток, выделенные компоненты клеток, макромолекулы. Окраски – соли тяжелых металлов (уран, свинец, осмий и др.), наночастицы золота, напыление платиной и т.д.

Сканирующий электронный микроскоп – поверхность клеток при увеличении 100-100000 раз.

Ультратонкий (~0.07 мкм) срез животной клетки



Растровая электронная микроскопия (во вторичных электронах)



Фиксация препаратов для микроскопии

Требования: быстрое проникновение в ткань, минимальное нарушение относительного расположения молекул (структуры), создание трехмерной прочной структуры (сшивки макромолекул), минимальная экстракция.

Фиксаторы для световой микроскопии: формалин и др. альдегиды, специальные фиксаторы (уксусная кислота, метиловый спирт и проч.)

Фиксатор для электронной микроскопии: глутаровый альдегид, затем OsO_4 (на буфере, pH 7.2).

Быстрое замораживание с последующей химической фиксацией.

Получение препаратов для микроскопии

Обезвоживание фиксированных образцов, пропитка и заключение в парафин или эпоксидную смолу.

Срезы: толщина 5 мкм для световой микроскопии (микротом) и 0,07 мкм для электронной микроскопии (ультрамикротом).

Окраски для световой микроскопии: общие (гематоксилин-эозин, азур-эозин и проч.) и специальные – выявление отдельных белков, углеводов и др. компонентов (цитохимия, иммунохимия).

Окраски для электронной микроскопии: общие (уранил-ацетат-цитрат свинца) и специальные (иммунохимия с наночастицами золота).

Ограничения микроскопического анализа

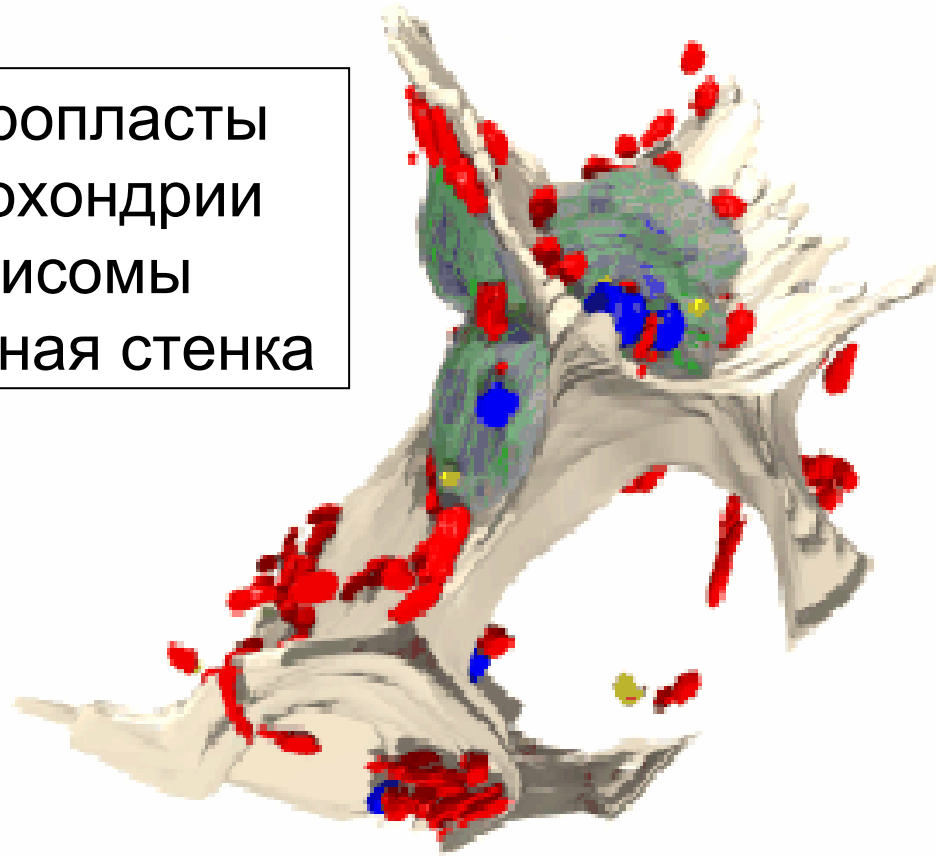
Световой микроскоп – малая глубина резкости при большом увеличении (оптические срезы около 0,5 мкм); разрешающая способность ограничена диском Эри.

Электронный микроскоп – малая проникающая способность электронов (0,1-1 мкм).

Поэтому объемное увеличенное изображение всегда есть результат реконструкции или томографии.

Томография в ЭМ

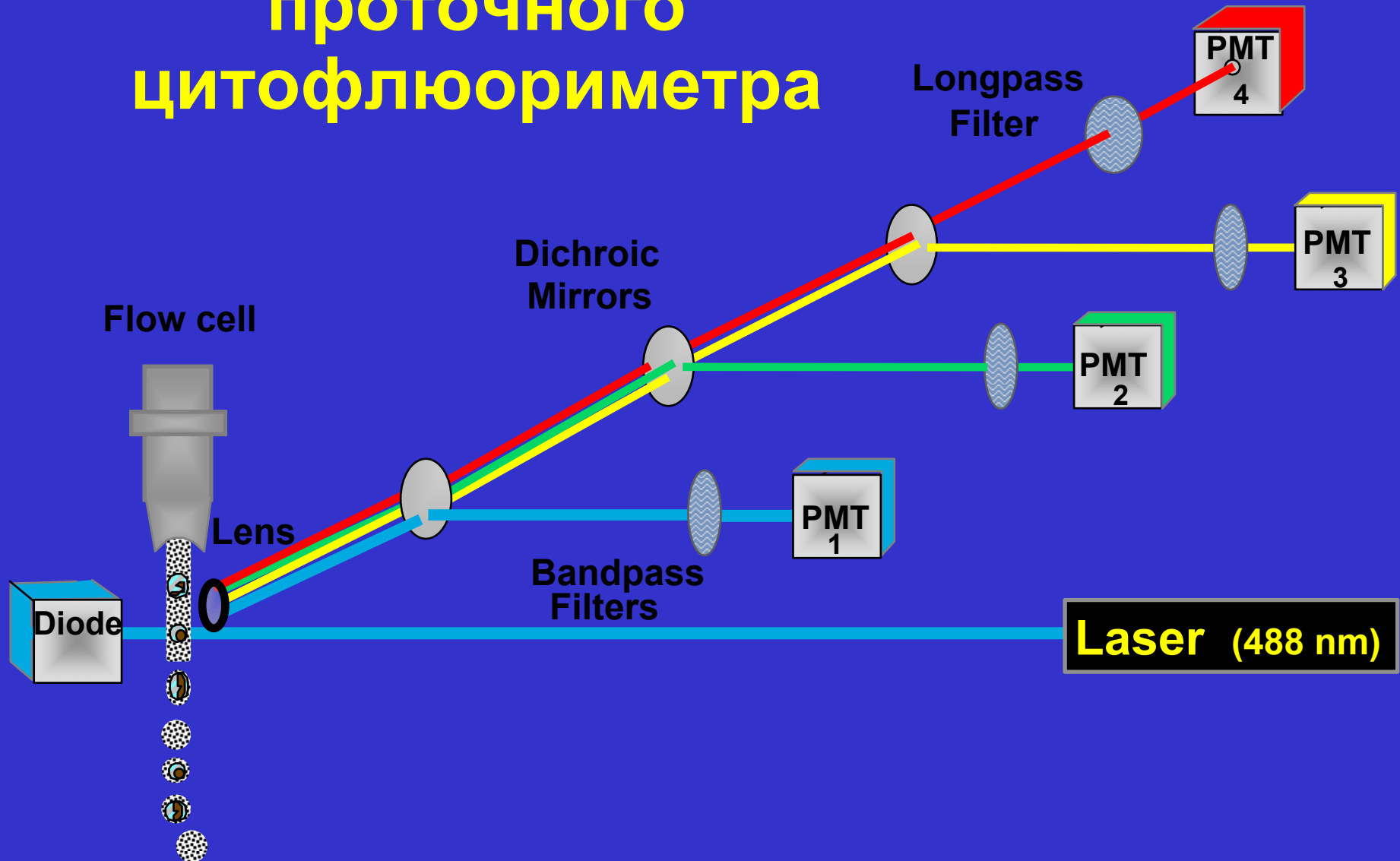
зеленые – хлоропласты
красные – митохондрии
синие – пероксисомы
серая – клеточная стенка



Проточный флюориметр



Схема простейшего проточного цитофлюориметра

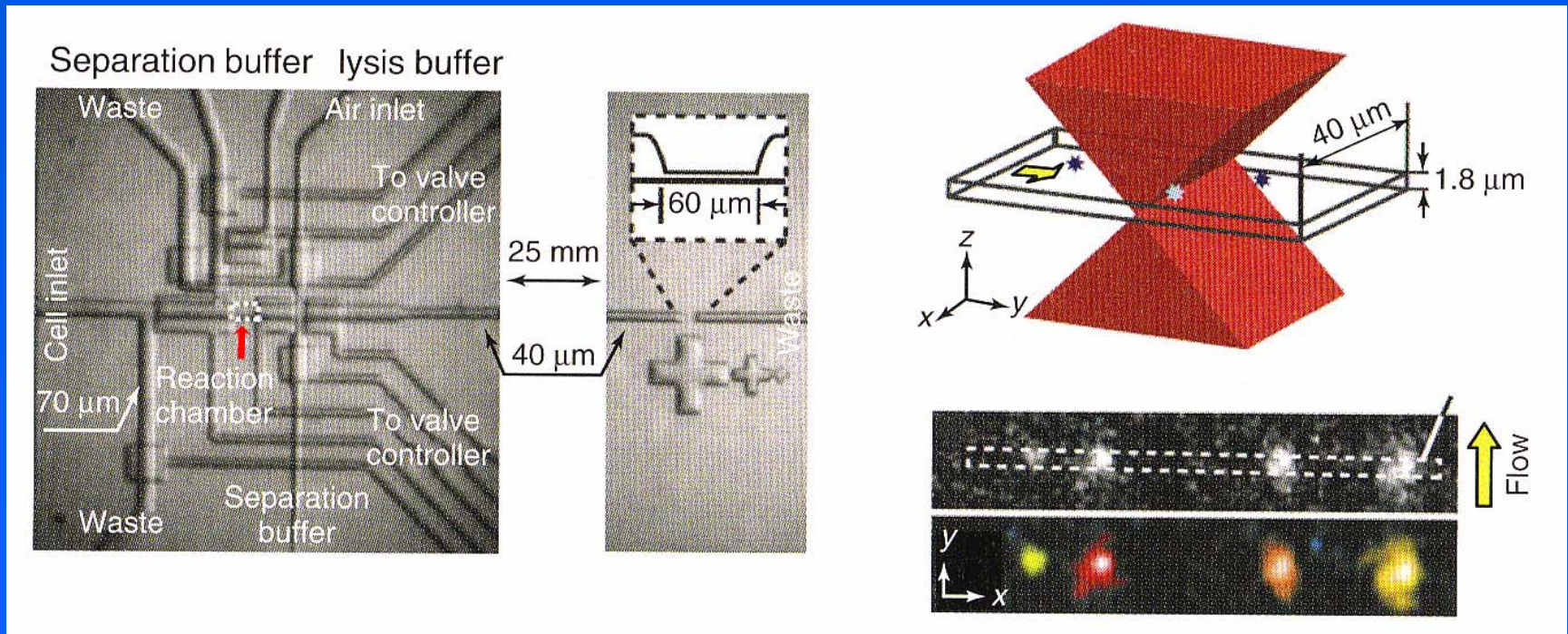


(modified from Purdue University
Cytometry Laboratories)

Молекулярные методы исследования

1. Выделение белков, нуклеиновых кислот, липидов и т.д.: ультрацентрифугирование; гель-фильтрация; электрофорез (хроматография); иммунохимия и их сочетания.
2. Исследования фрагментов ДНК - полимеразная цепная реакция (ПЦР); секвенирование нуклеиновых кислот.
3. Исследования белков и их фрагментов (MALDI-спектрометрия и др.).
4. Визуализация отдельных молекул с помощью флюоресцентных меток (световая микроскопия).

Чип для исследования отдельных клеток



Слева – ячейка для манипуляций с отдельными клетками; в центре – отсек для детектирования отдельных молекул. Справа: вверху – схема лазерной перетяжки; внизу – фотографии отдельных молекул (кадр с ПЗС-камеры).